УДК 619:636.09:633.88

Исаева А.Ю., Староверов С. А., Волков А. А., Ларионов С. В., Козлов С. В.
(Саратовский ГАУ, Саратовский НИВИ РАСХН, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, г. Саратов)

ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ НАНО РАЗМЕРНОЙ СТРУКТУРЫ НА ОСНОВЕ КОЛЛОИДНОГО СЕЛЕНА IN VITRO

Ключевые слова:коллоидный селен, лактоферрин, иммунитет, наночастица, иммуностимулятор.

В последнее время большое внимание уделяется использованию в ветеринарной медицине биологически активных веществ природного происхождения, обладающих антимикробным и иммунопротективным действием. Данные соединения позволяют снизить количество применяемых хемотерапевтических средств и, тем самым, повысить качество получаемой сельскохозяйственной продукции [1-3].

Одним из таких веществ является лактоферрин – белок сыворотки молока млекопитающих, железосвязывающий, многодоменный, полифункциональный гликопротеид. Наибольший спектр биологической активности обнаружен у пептидных фрагментов лактоферрина, получаемых при его протеолизе [4]. По литературным данным продукты протеолиза лактоферрина обладают целым рядом биоактивных свойств, обнаруженных in vitro. Так, они являются фактором опсонизации и усиления завершенности фагоцитоза, обладают антимикробной, антивирусной, противогрибковой и противогельминтной активностью, тормозят адгезию бактерий на клетках макроорганизма [5-7]. Все перечисленные выше свойства делают лактоферин интересным объектом для изучения и использования в фармакологии. Однако, многие вопросы, касающиеся лактоферина и его использования, до сих пор остаются недостаточно изученными.

Так же особый интерес представляет микроэлемент селен. В организме нет такого органа или системы где не использовался бы селен. Этот микронутриент участвует в обмене белков и нуклеиновых кислот, входит в состав ферментов и гормонов, участвует в реакциях иммунитета, воспаления и регенерации. Селеносодержащие белки формируют костную и хрящевую ткани, поддерживают работу скелетных и гладких мышц, контролируют гормональный баланс. Все перечисленные выше свойства делают селен интересным объектом для изучения и использования в фармакологии. Вместе с этим многие вопросы, касающиеся влияния коллоидного селена на иммунную систему до сих пор остаются недостаточно изученными. Коллоидные частицы имеют некоторое преимущество перед другими наночастицами, благодаря своему мелкому размеру (от 5 до 100 нм), большой свободной поверхности, низкой токсичности, клеточной пенетрабельности и возможности поверхностной модификации.

В связи с этим мы поставили целью в начале нашей работы изучить некоторые биодинамические параметры комплекса коллоидного селена конъюгированного с лактоферрином in vitro.

Материалы и методы исследований. Коллоидный селен синтезировался нами по методу Bo Huang et al (2003). Использованные в работе культуры клеток почек эмбрионов свиньи (SPEV), получены из криобанка коллекции клеточных культур лаборатории вирусологии научно-исследовательской ветеринарного института Российской академии сельскохозяйственных наук (РАСХН) (Саратов). Культивирование клеточных культур проводили в пластиковых флаконах в полной RPMI среде (10% эмбриональной сыворотки, гентамицин, ампициллин, амфотерицин) при 37° С. Диссоциация клеток монослойной культуры достигалась промыванием монослоя раствором трипсина в течение 10 мин.

Выделение и культивирование перитонеальных макрофагов и клеток селезенки проводилось по стандартным методикам (Пастер Е.У., Овод В.В., Позур В.К., Вихоть Н.Е. 1989). Пролиферативную активность клеток селезенки проверяли по методу предложенному Кузаковой Н. А. (2002) и Berridge V. M. (1996).

Проведение МТТ теста: МТТ-тест проводили по следующей методике: чистую культуру клеток и клетки с добавлением препаратов инкубировали по 500 мкл в пробирках эппендорф при 37^0С в течение 48 часов. Каждую пробирку с клеточны-

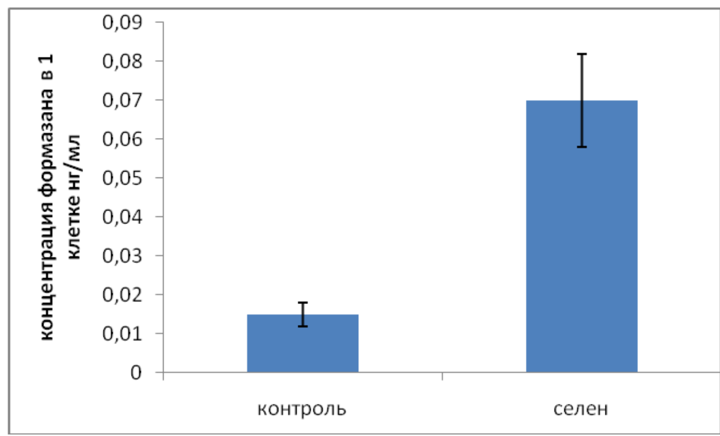


Рис. 1. Изменение дыхательной активности в клеточной популяции при культивировании их в присутствии препарата коллоидного селена ($P<=0,05$)

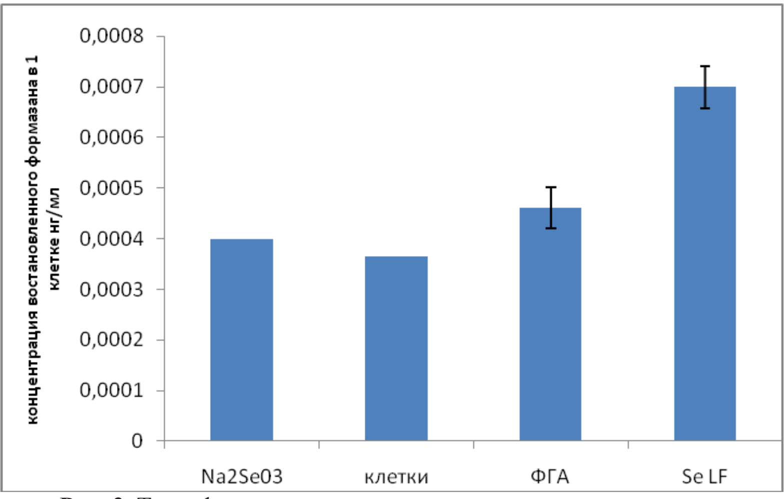


Рис. 2. Трансформирующая активность клеток селезенки крыс в присутствие конъюгатов коллоидного селена.

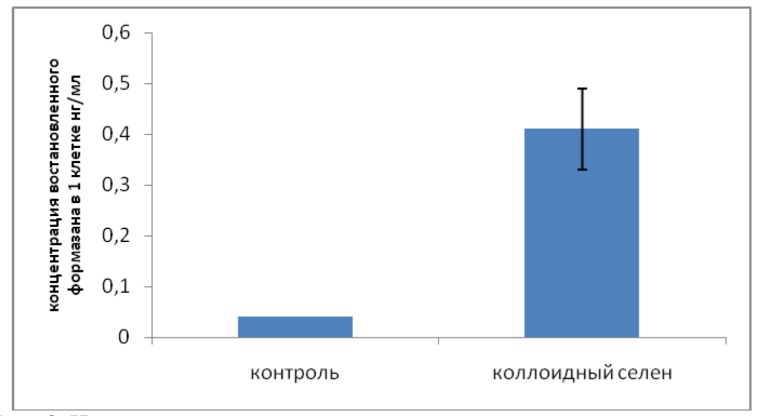


Рис. 3. Изменение дыхательной активности перитонеальных клеток крыс в присутствие конъюгатов коллоидного селена.

ми суспензиями по окончании инкубирования центрифугировали 10 мин при 1000 g. Перерастворяли полученный осадок в 500 мкл раствора МТТ и инкубировали в течение часа. После инкубации клетки перерастворяли в 500 мкл ДМСО, отбирали по 200 мкл суспензии из каждой пробирки и помещали в лунки 96-луночного плоскодонного планшета. Показания оптической плотности считывали на планшетном ридере Multiscan Ascent Thermo (Scientific) (Bernas T., Dobrucki J.W. 2000).

При изучении взаимодействия коллоидного селена с перитениальными и лимфойдными клетками к 1 мл клеточной суспензии с количеством клеток $1*10^8$- 10^9 вносится 0,5 конъюгат селена с лактоферрином с концентрацией белка 1мг на мл перерастворенный в полной RPMI среде. В работе использовали следующие контроли это клетки с селинитом натрия, клетки культивируемые с ФГА и чистые клетки (клетки без внесённых препаратов). Ставится на ночь в термостат 37^0С. На следующий день клетки собираются центрифугированием отмываются и проводится измерение МТТ-теста.

При изучении влияния коллоидного селена на окислительно-восстановительные процессы клеток препарат вносился в монослойную культуру клеток в концентрации 1 мг на 10 мл среды. Культивирование проводили в течение 48 часов после чего клетки снимались трипсинизацией и у них определялась интенсивность дыхания в МТТ тесте.

При изучении влияния препарата на дыхательную активность клеток в качестве контроля использовались 100 мкл клеточных суспензий в 1 мл питательной среды. В качестве опыта использовались 100 мкл клеточных суспензий с препаратом (7.5 мкг/мл) в 1 мл питательной среды с антигеном. Итоговая концентрация клеток составила 2×107 клеток в 1 мл. Клетки культивировались в присутствие препарата в течение 24 – 72 часов (в зависимости от задачи) при 37^0С.

Результаты и обсуждение. Исследование биологической активности комплекса коллоидного селена конъюгированного с лактоферрином проводились на клеточной линии SPEV-2.

Культивирование клеток в присутствие нашей нанокомпозиции, приводит к повышению их дыхательной активности в 4 раза (рис 1). Что может говорить о способности препарата активировать окислительные процессы клеточного метаболизма.

Отметив стимуляцию клеточного дыхания у клеток линии SPEV-2, мы в дальнейшем провели исследования по изучению влияния коллоидного селена на стимуляцию пролиферативной активности лимфоидных клеток.

Проведя данные исследования, мы отметили, что коллоидный селен, вызывал повышение пролиферативной активности клеток на 91%, селенит натрия на 9%, а фитогемагглютинин на 26% по сравнению с контролем (рисунок 2).

Отметив дыхательную активность клеток селезенки, мы провели изучение влияния нашего препарата на дыхательную активность фагоцитирующих клеток в частности перитонеальных клеток крыс. На рисунке 3 можно отметить, что дыхательная активность перитонеальных клеток возрастает в присутствие нашего препарата в 10 раз, что может указывать на способность селена активировать клеточную активность.

Заключение: анализируя полученные данные, хочется отметить, что данный комплекс обладает ярко выраженными иммуномодулирующими свойствами, что в дальнейшем позволит создать препараты, обладающие высокой биологической активностью и низкой токсичностью, и даст возможность провести конструирование иммуномодулирующих и вакцинных препаратов.

Резюме: В работе изучается влияние композиции на основе коллоидного селена коньюгированного с полипептидными комплексами для повышения стимулирующего влияния клеточного и гуморального иммунитета, путем непосредственной презентации активных компонентов препаратов в клетки ретикулоэндотелиальной системы.

SUMMARY
The work is devoted to the study of composition on the basis of colloidal selenium with lactoferrin which stimulates the immunity.

Keywords:colloidal selenium, lactoferrin, immunity, nano-part, immunostimulant.

Литература

1. Miedzobrodzki J., Naidu A.S., Watts J.I., Ciborowski P., Palm K., Wadsröm T. Effect of milk on fibronectin and collagen type I binding to Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis // J. Clin. Microbiol. 1989. V. 27. P. 540-544.

2. Miyauchi H., Kaino A., Shinoda I., Fukuwatari Y., Hayasawa H. Immunomodulatory effect of bovine lactoferrin pepsin hydrolysate on murine splenocytes and Peyer's patch cells // J. Dairy Sci. 1997. V. 80. P. 2330-2339.

3. Holmgren J., Svennerholm A.M., Ahrén C. Nonimmunoglobulin fraction of human milk inhibits bacterial adhesion (hemagglutination) and enterotoxin binding of Escherichia coli and Vibrio cholerae // Infect. Immun. 1981. V. 33. P. 136-141.

4. Dionysius D.A., Milne J.M. Antibacterial peptides of bovine lactoferrin: purification and characterization // J. Dairy. Sci. 1997. V. 80. P. 667-674.

5. Dionysius D.A., Grieve P.A., Milne J.M. Forms of lactoferrin: their antibacterial effect on enterotoxigenic Escherichia coli // J. Dairy Sci. 1993. V. 76. P. 2597-2606.

6. Naidu A.S. Lactoferrin: Natural, Multifunctional, Antimicrobial. - Boca Raton, FL: CRC Press, 2000. 86 p.

7. Zimecki M., Mazurier J., Machnicki M., Wieczorek Z., Montreuil J., Spik G. Immunostimulatory activity of lactotransferrin and maturation of CD4- CD8- murine thymocytes // Immunol. Lett. 1991. V. 30. P. 119-124.

8. Гринь В.А., Родионова Т.Н., Строгов В.В. Фармакокорекция селеновой недостаточности у телят на откорме. – Краснодар. – Ветеринария Кубани, № 6, 2011. – с. 25-26.

Контактная информации об авторах для переписки

Исаева Анна Юрьевна соискатель кафедры «Терапия, акушерство и фармакология» ФГБОУ ВПО Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова

Староверов Сергей Александрович доктор биологических наук начальник отдела биохимии и иммунологии ГНУ Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт РАСХН г. Саратов, профессор кафедры «Терапия, акушерство и фармакология» ФГБОУ ВПО Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова

Волков Алексей Анатольевич доктор ветеринарных наук, заведующий кафедрой «Терапия, акушерство и фармакология» ФГБОУ ВПО Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова

Ларионов Сергей Васильевич доктор ветеринарных наук, профессор, заведующий кафедрой «Паразитологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы», член - корреспондент Российской Академии сельскохозяйственных наук, заслуженный ветеринарный врач РФ

Козлов Сергей Васильевич кандидат ветеринарных наук, доцент кафедры «Терапия, акушерство и фармакология» ФГБОУ ВПО Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова

УДК 619:636.09:633.88

Исаева А.Ю., Староверов С. А., Волков А. А., Ларионов С. В., Козлов С. В.
(Саратовский ГАУ, Саратовский НИВИ РАСХН, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, г. Саратов)

КОНСТРУИРОВАНИЕ НАНО РАЗМЕРНОЙ СТРУКТУРЫ НА ОСНОВЕ КОЛЛОИДНОГО СЕЛЕНА

Ключевые слова: коллоидный селен, наночастица, наноноситель, наноплатформа.

Одной из важнейших проблем в фармацевтической отрасли остается адресная доставка лекарственных веществ предназначенная для повышения эффективности лечения. Как известно, традиционные лекарственные формы содержат одно или несколько индивидуальных лекарственных веществ в формах, пригодных для энтерального или парентерального введения. Применяемые подходы к введению лекарств в организм человека и животных, основанные на использовании общепринятых лекарственных форм, имеют целый ряд существенных недостатков: